

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
12. April 2001 (12.04.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 01/25278 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C07K 14/62,  
C12N 15/10, 15/63, 15/70

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/09017

(22) Internationales Anmeldedatum:  
15. September 2000 (15.09.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
199 47 456.7 2. Oktober 1999 (02.10.1999) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND  
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt  
(DE).

(72) Erfinder: HABERMANN, Paul; Rosserstrasse 35,  
65817 Eppstein (DE). ERTL, Johann; Goethes-  
trasse 1, 65817 Eppstein (DE). MEIWES, Johannes;  
Theodor-Fliegener-Strasse 39, 65510 Idstein (DE).  
SEIPKE, Gerhard; Wiesenstrasse 44, 65719 Hofheim  
(DE).

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,  
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eura-  
sisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI,  
FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI-Patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,  
SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: C-PEPTIDE FOR THE IMPROVED PRODUCTION OF INSULIN AND INSULIN ANALOGUES

(54) Bezeichnung: C-PEPTID ZUR VERBESSERTEN HERSTELLUNG VON INSULIN UND INSULINANALOGA

(57) Abstract: The invention relates to a precursor of human insulin or an insulin analogue of the formula (I):  
Fus-B(1-30)-RDVP-Y<sub>n</sub>-A(1-21), whereby Fus is an optionally present fusion component of any sequence, B(1-30) is the B chain  
of human insulin, Y stands for an amino acid chain which ends with a C-terminal basic amino acid, n is 2 to 50 and indicates the  
length of the amino acid chain Y and A(1-21) is the A chain of human insulin. The A and/or the B chain can be modified by  
means of amino acid exchanges, deletions and/or additions. The invention also relates to a DNA coding therefor. The invention  
further relates to the production and the use of the precursor and the DNA as well as to a method for producing human insulin or  
an insulin analogue.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung bezieht sich auf einen Vorläufer von humanem Insulin oder eines Insulinanalogons der  
formel (I): Fus-B(1-30)-RDVP-Y<sub>n</sub>-A(1-21); wobei Fus ein optional vorhandener Fusionsanteil beliebiger Sequenz ist; B(1-30) die  
B-Kette von humanem Insulin ist, Y für eine Aminosäurekette steht, welche mit einer basischen Aminosäure C-terminal endet;  
n gleich 2 bis 50 ist und die Länge der Aminosäurekette Y angibt; und A(1-21) die A-Kette von humanem Insulin ist, und die  
A-und/oder die B-Kette durch Aminosäureaustausche, Deletionen und/oder Additionen modifiziert sein können, eine DNA kodierend  
dafür, Herstellung und Verwendung von Vorläufer und DNA sowie ein Verfahren zur Herstellung von humanem Insulin oder eines  
Insulinanalogons.



WO 01/25278 A1

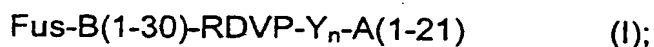
# C – Peptid zur verbesserten Herstellung von Insulin und Insulinanaloga

Die vorliegende Erfindung betrifft ein synthetisches Derivat des C – Peptides aus Proinsulin. Proinsulin, enthaltend dieses Derivat, hat auf verschiedene Art und Weise  
5 bessere Eigenschaften als gewöhnliches Affenproinsulin, insbesondere verbessert sich die Endausbeute des jeweiligen Insulinderivats bei dessen gentechnischer Herstellung.

Die Zahl der Erkrankungen an Diabetes nimmt weltweit stetig zu. Proportional dazu  
10 steigt der Bedarf an Insulin oder Derivaten des Insulin. Damit besteht die Aufgabe, die bestehenden Verfahren hinsichtlich der Ausbeute an Wirkstoff zu optimieren. Im Europäischen Patent EP-B1 0 489 780 ist ein Verfahren zur Herstellung von Insulin oder Derivaten hiervon vorgeschlagen. Die dort beschriebenen Vektoren dienen zur Herstellung von Humaninsulin mit dem Plasmid pINT90d oder als Ausgangsplasmide  
15 zur Konstruktion des in der Europäischen Patentanmeldung EP-A 0 821 006 beschriebenen Plasmides pINT302d, das zur Herstellung eines His(B31) His(B32) Gly(A21) – Insulinderivates dient, oder zur Konstruktion des in der Europäischen Patentanmeldung EP-A 0 885 961 beschriebenen Vektors pINT329d, der zur Herstellung des Lys(B3) Glu(B29) Insulinderivates dient.

20

Es wurde nun gefunden, daß besonders vorteilhafte Proinsulinderivate solche der Formel I sind,



25 wobei

Fus	ein optional vorhandener Fusionsanteil beliebiger Sequenz ist;
B(1-30)	die B-Kette von humanem Insulin ist,
Y	für eine Aminosäurekette steht, welche mit einer basischen Aminosäure C-terminal endet;
30 n	gleich 2 bis 50 ist und die Länge der Aminosäurekette Y angibt; und
A(1-21)	die A-Kette von humanem Insulin ist,

und die A- und/oder die B-Kette durch Aminosäureaustausche, Deletionen und/oder Additionen modifiziert sein können. Überraschend werden dabei je nach Zusammensetzung der Insulin A – bzw. – B – Kette gleiche und voneinander verschiedene Vorteile beobachtet.

5

Verbindet man die humane B- mit der humanen A-Kette über das vorteilhafte C-Peptid, so entsteht ein Proinsulin, das sich bzgl. Expressionsausbeute wie Wildtyp- Proinsulin verhält, dessen enzymatische Prozessierung zu Insulin aber leichter steuerbar ist, so daß keine störende Spuren von um Arginin verlängerter B – Kette entstehen, die bei  
10 der Herstellung zum Arzneimittel abgetrennt werden müssen, wodurch Ausbeuteverluste auftreten.

Verbindet man eine um di - Histidin C- terminal verlängerte B- Kette mit der A- Kette von Humaninsulin, die in Position A21 Glycin enthält, mit dem erfindungsgemäßen C-  
15 Peptid, so beobachtet man eine um ca. 20% höhere Expressionssausbeute im Vergleich zu den mit dem Plasmid pINT90d erzielbaren Ausbeuten und eine fast fünffach höhere Ausbeute, als dies mit dem Plasmid pINT302d beobachtet wurde. Zudem ist die Steuerung der enzymatischen Prozessierung ebenso vereinfacht, wie vorher beschrieben wurde.

20

Verbindet man eine Lys(B3) Glu (B29) modifizierte B- Kette mit der A – Kette von Humaninsulin über das modifizierte C- Peptid, so beobachtet man verbesserte Faltungseigenschaften des Proinsulinderivates im Vergleich zu dem von pINT329d kodierten Proinsulin. Die Ausbeute an Rohfusionsprotein ist erhöht und erreicht ein  
25 gleiches Niveau wie mit dem Plasmid pINT90d beobachtet wird. Zudem ist die Steuerung der enzymatischen Prozessierung vereinfacht.

Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform des neuen C –Peptids ist durch folgende Aminosäuresequenz charakterisiert :

30

CGCGATGTTCTCAGGTGGAGCTGGGCGGGGGCCCTGGCGCAGGCAGCCTGCAGCCCTTG

35

R D V P Q V E L G G G P G A G S L Q P L -

GCGCTGGAGGGGTCCTGCAGAAGCGC (SEQ ID NO.: 1)

A L E G S L Q K R (SEQ ID NO.: 2)

5 Ebenfalls angegeben ist eine von vielen möglichen DNA-Sequenzen, die für das angegebene C-Peptid kodiert.

Ein Gegenstand der Erfindung ist ein Vorläufer von humanem Insulin oder eines  
10 Insulinanalogons der Formel I

Fus-B(1-30)-RDVP-Y<sub>n</sub>-A(1-21) (I);

wobei

15 Fus ein optional vorhandener Fusionsanteil beliebiger Sequenz ist;  
B(1-30) die B-Kette von humanem Insulin ist,  
Y für eine Aminosäurekette steht, welche mit einer basischen  
Aminosäure C-terminal endet;  
n gleich 2 bis 50 ist und die Länge der Aminosäurekette Y angibt;  
20 und  
A(1-21) die A-Kette von humanem Insulin ist,

und die A- und/oder die B-Kette durch Aminosäureaustausche, Deletionen und/oder  
Additionen modifiziert sein können, insbesondere wobei Y<sub>n</sub> für die Aminosäuren 5 bis  
25 35 des C-Peptids von humanem oder Affen-Insulin steht, bevorzugt, wobei Y<sub>n</sub> für die  
Aminosäuren 11 bis 35 von humanem Insulin steht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Vorläufer wie oben beschrieben, wobei  
die B-Kette von humanem Insulin die Modifikationen Lys(B3) Glu(B29) oder wobei die  
30 B- und A-Ketten von humanem Insulin die Modifikationen His(B31) His(B32) Gly(A21)  
enthalten.

Darüberhinaus ist Gegenstand der Erfindung eine DNA, kodierend für einen Vorläufer  
wie oben beschrieben.

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, enthaltend eine DNA, kodierend für einen Vorläufer wie oben beschrieben, vorzugsweise, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Expressionsvektor geeignet zur Expression in *E.coli* ist.

5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine *E.coli*-Zelle, enthaltend einen Vektor wie oben beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Vorläufers wie oben beschrieben, wobei

- 10 (a) eine DNA wie oben beschrieben in einen Vektor wie oben beschrieben eingebracht wird;
- (b) der Vektor aus (a) in eine *E.coli*-Zelle eingeschleust wird;
- (c) die *E.coli*-Zelle aus (b) enthaltend den Vektor aus (a) zur Expression benutzt wird; und
- 15 (d) der Vorläufer aus dem Kulturüberstand isoliert wird.

Darüberhinaus ist Gegenstand der Erfindung ein Verfahren zur Herstellung einer DNA wie oben beschrieben, wobei

- 20 (a) ausgehend von der cDNA des humanen oder Affen-Insulin mittels PCR und anderer molekularbiologischen Techniken diese DNA erzeugt und
- (b) isoliert wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung von humanem Insulin, oder eines Insulinanalogons, wobei

- 25 (a) ein Vorläufer wie oben beschrieben gemäß dem Verfahren wie oben beschrieben erzeugt wird;
- (b) der Vorläufer gemäß (a) unter geeigneten Bedingungen so gefaltet wird, daß sich die Disulfidbrücken wie in Humaninsulin ausbilden können, und der RDVP-Y<sub>n</sub>-Teil und gegebenenfalls der Fusionsanteil Fus enzymatisch
- 30 entfernt werden; und
- (c) das humane Insulin oder das Insulinanalogon aufgereinigt wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines Vorläufers wie oben beschrieben zur Herstellung von Insulin oder eines Insulinanalogons, vorzugsweise wobei die Herstellung von Insulin oder einem Insulinanalogon gemäß dem Verfahren wie oben beschrieben erfolgt.

5

Des weiteren ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung einer DNA wie oben beschrieben zur Herstellung eines Vorläufers wie oben beschrieben.

---

Auch ist Gegenstand der Erfindung die Verwendung eines Vektors wie oben  
10 beschrieben zur Herstellung eines Vorläufers wie oben beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung einer *E.coli*-Zelle wie oben beschrieben zur Herstellung eines Vorläufers wie oben beschrieben.

15 Die Erfindung wird nun anhand der Beispiele näher erläutert, ohne sich aber darauf zu beschränken.

Beispiel 1: Expression von Proinsulinderivaten

20 Die Expression erfolgt wie in EP-B1 0 489 780 beschrieben. Dabei können bei Fermentation im großen Volumen Modifikationen eingeführt werden. Beim Vergleich der Expressionsraten werden aber stets die gleichen Bedingungen eingehalten.

Für das Arbeiten in größeren Maßstäben gilt folgendes allgemeines

25 Fermentationsrezept, das beispielhaft für ein Volumen von 7,5 Litern beschrieben wird :

Fermentationsvolumen : 7,5 l

Sterilisationsbedingungen : 121°C, 20 Minuten, bei pH 3,5, nach Sterilisation mit  
30 NH<sub>3</sub> auf 7,0 eingestellt.

Fermentationstemperatur : 37°C

pH-Regulierung : pH 7,0, Einstellung mit 25% Ammoniakwasser

- Rührerdrehzahl : 1500 UpM
- Belüftung : 15 NI/min (2 vvm)
- Dauer : ca. 24h
- Feeding : 65%ige Glucose wurde ab einem OTR-Wert von 200  
 5 mmol $\cdot$ l $^{-1}$ h $^{-1}$  mit einer konstanten Rate von 12 gl $^{-1}$ h $^{-1}$  zudosiert.
- Vorkultur : Eine Schüttelkultur wurde mit einer Seed-Ampulle beimpft und für 3 - 4h bei 37°C , 250 UpM bis zu einer OD A<sub>540</sub> ~ 1 inkubiert.
- 10 Beimpfung : Die Fermenter wurden mit etwa 40 ml Vorkultur angeimpft.
- Induktion : Bei einer A<sub>540</sub> von  $\geq 40$  mit 40 mg/l (300 mg / Fermenter) Indolpropionsäure gelöst in ca. 10 ml einer wäßrigen Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lsg. (mit 0,17g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).

15

Hierbei bedeuten NI = Normliter, vvm = Volumen/Volumen/Minute und OTR = Oxygen Transfer Rate.

#### Fermentationsmedien:

20

<u>Rezeptnummer GAI 100/95-000:</u>	<u>Menge g/l</u>
Glucose-1-hydrat, D(+) min . 80%	44
Citronensäure-1-hydrat	3,48
Ammoniumsulfat min.95%	6,0
25 Phosphorsäure, ortho, 85%	2,99
Di-Kalium-hydrogenphosphat	1,18
Natriumsulfat	3,0
Magnesiumsulfat-7-hydrat, minimum 98%	2,0
Eisen(III)-sulfat x H <sub>2</sub> O	0,5
30 Spurenelementlsg.: RL 1/85-000	1,0 ml
Thiamin-HCl	0,005
Desmophen 3600	0,5

## Spurenelementlsg.:

<u>RL 1/85-000</u>	<u>Menge g/l</u>
Kupfer(II)sulfat-5-hydrat	1,6
5 Kaliumjodid	4,0
Ammoniummolybdat-4-hydrat	8,0
Mangan(II)-sulfat-1-hydrat	12,3
Zinksulfat-7-hydrat	16
Borsäure	20

10

Medium im Schüttelkolben:

	<u>Menge g/l</u>
Hefeextrakt	8,0
Glucose	1,0
15 NaCl	3,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,32
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,68

## 20 Beispiel 2: Herstellung von Insulinen

Die Herstellung von Insulinen erfolgt gemäß bekannter Methoden, wie sie z.B. in EP-B1 0 489 780 oder EP-A 0 885 961 beschrieben oder diskutiert wurden. Bevorzugt zur Faltung und Aufarbeitung des jeweiligen Fusionsproteins ist dabei die in EP-B1 0 668 25 282 (s. Beispiel 2) beschriebene Methode. Dabei kann nach Faltung entsprechend EP 0 288 809 der Ansatz vor weiterer Aufarbeitung filtriert werden.

Beispiel 3: Konstruktion des Plasmids pINT358d kodierend für das in bezug auf die C-Kette derivatisierte humane Proinsulin B – RDVP C<sub>11-35</sub> – A

30 Zur Herstellung des Plasmides wurden die in EP-B1 0 489 780 beschriebenen Primer Tir und Insu11 verwendet. Zusätzlich wurden zwei neue Primersequenzen synthetisiert.



Primer PINT358fIII hat folgende Sequenz:

5'- CCC AAG ACC CGC GAT GTT CCT CAG GTG GAG CTG GGC GGG GGC CCT - 3' (SEQ ID NO.:3)  
 B28 B29 B30 Arg Asp Val Pro C11 C12 C13 C14 C15 C16 C17 C18 (SEQ ID NO.: 4)

5

Primer PINT358revII hat die Sequenz:

5'- CAGCTCCACCTGAGGAACATCGCGGGTCTTGGGTGTGTAG - 3' (SEQ ID NO.: 5)

- 10 Mit DNA des Plasmides pINT90d als Matrize werden mit den Primerpaaren Tir/PINT358revII und Insu11/PINT358fIII entsprechend EP-B1 0 489 780 je eine PCR durchgeführt. Aliquots der Produkte der beiden Reaktionen werden kombiniert und zusammen mit dem Primerpaar Tir/Insu11 in einer dritten PCR eingesetzt. Das Produkt dieser Reaktion wird mit den Enzymen Sall/NcoI doppelverdaut und das
- 15 Produkt dieses Restriktionsverdaus nach Reinigung in die mit NcoI/Sall geöffnete Vektor DNA des ebenfalls in EP-B1 0 489 780 beschriebenen Plasmides pINT91d inseriert. Das so konstruierte Plasmid erhält die Bezeichnung pINT358d. Die Struktur wird mittels DNA – Sequenzanalyse bestätigt. Kompetente *E.coli* Zellen werden mit DNA des Plasmides transformiert. Die Expression des Proinsulins in Bakterien erfolgt
- 20 gemäß Beispiel 1. Nach Faltung gemäß Beispiel 2 erfolgt die enzymatische Umsetzung des Proinsulin zu Insulin und weitere Reinigung gemäß EP-B1 0 347 781. Dabei kann im Vergleich zu dem aus pINT90d abgeleiteten Verfahren im Ionentauscherchromatographieschritt eine Randfraktion zusätzlich aufgefangen werden, da diese nicht mit Arg(B31) – Insulin kontaminiert ist.

25

Beispiel 4: Konstruktion des Plasmides pINT362d zur Herstellung von  
 Lys(B3)Glu(B29) – RDVP –C<sub>11-35</sub> –Proinsulin

- 30 Zur Konstruktion des Plasmides werden DNA der Plasmide pINT329d und pINT358d als Matrize und die Primer Tir und Insu11 benötigt. Zusätzlich werden zwei neue Primer Salfoward und 329rev synthetisiert.

Primer Salfoward hat die Sequenz :

- 35 5' - TACACACCCGAGACCCGCGATGTTCTCAGG - 3' (SEQ ID NO.: 6)

Dabei markiert der fett gedruckte Sequenzabschnitt die Sequenz, die mit dem Plasmid pINT358d hybridisiert während der restliche Teil homolog zu Sequenzen des die B-Kette kodierenden Abschnittes des Plasmides pINT329d ist.

5 Primer 329rev hat folgende Sequenz :

5' - CCTGAGGAACATCGCGGGTCTCGGGTGTGTAG - 3' (SEQ ID NO.: 7)

Dabei markiert der fett gedruckte Abschnitt die Region, die homolog zu dem Antisense  
10 Strang ist, der das Ende der B-Kette bildet und das Triplett für Arginin im Plasmid pINT329d beschreibt. Die restliche Sequenz hybridisiert mit Plasmid pINT358d. Zwei PCR – Ansätze werden durchgeführt Dabei dient die DNA des Plasmides pINT329d als Matrize für das Primerpaar Tir / 329rev und pINT358d DNA als Matrize für das Paar Salfoward / Insu11.

15

Beide Reaktionen resultieren in Fragmenten, die sich um die Sequenz des Primer Salfoward überlappen. Damit können die beiden Fragmente in einer dritten PCR vereinigt werden und mit Hilfe der Primer Tir und Insu11 zu einer DNA – Sequenz  
zusammengefügt werden, die das Insulinanalogon kodiert. Dieses Reaktionsprodukt  
20 wird mit den Restriktionsenzymen NcoI/SalI gespalten und anschließend in das SalI/NcoI geöffnete Vektorfragment aus pINT91d insertiert. Kompetente Zellen des Stammes *E.coli* K12 MM294 werden mit dem entsprechenden Ligationsansatz transformiert. Plasmid DNA wird von Transformanten isoliert und charakterisiert. Das richtige Plasmid erhält die Bezeichnung pINT362d.

25

Nach Expression wird eine zu pINT90d vergleichbare Rohausbeute an Fusionsprotein beobachtet. Jedoch ist die beobachtete Faltungsausbeute im Vergleich zu pINT329d um ca 40% besser.

30

Die Struktur des Fusionsproteins kodiert durch pINT362d sieht wie folgt aus:

35 MATTSTGNSAR FVKQHL CGSHLVEALYLVCGERGFFYTPET RDVPQVELGGGPG

Fusions-  
Anteil

B - Kette

C - Kette

5 AGSLQPLALEGSLQKR GIVEQCCTSI CSLYQLENYCN (SEQ ID NO.: 8)

C - Kette (Forts.) A - Kette

10

Beispiel 5: Konstruktion des Plasmides pINT349d zur Herstellung von His(B31)  
His(B32) Gly(A21)– RDVP –C<sub>11-35</sub>–Proinsulin

15 Zunächst wird das Plasmid pINT140d, dessen DNA das Insulinanalogon Gly (A21) –  
Insulin kodiert, hergestellt.

Dazu werden zwei Oligonukleotide zur Verwendung in einer PCR als Primer  
benötigt :

20

Oligonucleotid Tir wird als 'Sense' und Oligonukleotid 140drev als 'Antisense'-  
Primer verwendet:

25 140drev 5' - AAAGGTCGACTATTAGCCG CAGTA -3' (SEQ ID NO.: 9)  
Stop Stop Gly Cys Tyr  
A21A20 A19

30

Beide Primer werden in einer Standard PCR mit DNA des Plasmides pINT90d  
eingesetzt . Das Reaktionsprodukt wird entsprechend EP-B1 0 489 780 mit den  
Restriktionsenzymen NcoI und Sall umgesetzt und anschließend in den entsprechend  
geöffneten Vektor pINT69d eingesetzt. Es entsteht das Plasmid pINT140d das nach

35 Transformation in *E.coli* K12 MM294 reisoliert und mittels Restriktions - und  
Sequenzanalyse charakterisiert wird.

Ausgehend von der DNA des Plasmides pINT140d werden zwei PCR – Ansätze  
durchgeführt. Die erste Reaktion benutzt den Primer Tir und als reversen Primer

40 PINT349a mit folgender Sequenz:

Val Gln Pro Val Asp Arg His His Thr Lys Pro Thr Tyr (SEQ ID NO.: 10)  
 5' - CACCTGAGGAACATCGCGGTGGTGGGTCTTGGGTGTGTAG - 3'  
 5 (SEQ ID NO. 11)  
 C12 C11 \* \* \* \* B30 B29 B28 B27 B26

Dabei bezeichnen die mit Stern markierten Sequenzen die Codone für die neu  
 10 eingeführten Aminosäuren.

Die zweite PCR wird mit den Primern Inu11 und PINT349b durchgeführt.

Primer PINT349b hat die Sequenz :

15 Pro Lys Thr His His Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu (SEQ ID NO.: 12)  
 5' - ACCCAAGACCCACCGCGATGTTCTCAGGTGGAGCTG - 3'  
 (SEQ ID NO.: 13)  
 B28 B29 B30 \* \* \* \* C11 C12 C13 C14

20 Von Position 34 bis Position 1 der DNA – Sequenz ist der Primer komplementär zu  
 PINT349a. Daher können die Reaktionsprodukte der beiden PCR in einer dritten PCR  
 mit den Primer Tir und Insu11 zu dem DNA – Fragment zusammengefügt werden, das  
 für das gewünschte Proinsulinderivat kodiert. Das Produkt dieser Reaktion wird wie  
 beschrieben mit den Enzymen NcoI und Sall umgesetzt und in das mit diesen  
 25 Enzymen geöffnete Vektorfragment pINT91d eingesetzt und nach *E.coli* K12  
 transformiert. Nach Charakterisierung der Plasmide aus Transformanten erhalten  
 richtige Plasmidkonstruktionen die Bezeichnung pINT349d.

Exprimiert man das Fusionprotein, so zeigt sich ein deutliche Erhöhung der Ausbeute  
 an Fusionsprotein. Die Ausbeute ist überraschend ca 20% höher als dies mit pINT90d  
 30 zu erzielen ist und ca. 5 mal größer als mit Plasmid pINT30d erzielt. Die Faltungsrate  
 ist dabei vergleichbar mit der bei Affenpräproinsulin, kodiert von pINT90d, erzielten  
 Rate.

## Patentansprüche:

1. Vorläufer von humanem Insulin oder eines Insulinanalogons der Formel I

5 Fus-B(1-30)-RDVP-Y<sub>n</sub>-A(1-21) (I);

wobei

Fus ein optional vorhandener Fusionsanteil beliebiger Sequenz ist;

B(1-30) die B-Kette von humanem Insulin ist,

10 Y für eine Aminosäurekette steht, welche mit einer basischen Aminosäure C-terminal endet;

n gleich 2 bis 50 ist und die Länge der Aminosäurekette Y angibt;  
und

A(1-21) die A-Kette von humanem Insulin ist,

15

und die A- und/oder die B-Kette durch Aminosäureaustausche, Deletionen und/oder Additionen modifiziert sein können.

2. Vorläufer gemäß Anspruch 1, wobei Y<sub>n</sub> für die Aminosäuren 5 bis 35 des C-Peptids von humanem oder Affen-Insulin steht.

20

3. Vorläufer gemäß Anspruch 1, wobei Y<sub>n</sub> für die Aminosäuren 11 bis 35 von humanem Insulin steht.

- 25 4. Vorläufer gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die B-Kette von humanem Insulin die Modifikationen Lys(B3)Glu(B29) enthält.

5. Vorläufer gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die B- und A-Ketten von humanem Insulin die Modifikation His(B31)His(B32)Gly(A21) enthalten.

30

6. DNA, kodierend für einen Vorläufer gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.

7. Vektor, enthaltend eine DNA gemäß Anspruch 6.
8. Vektor gemäß Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Vektor ein Expressionsvektor geeignet zur Expression in *E.coli* ist.
- 5 9. *E.coli*-Zelle, enthaltend einen Vektor gemäß Anspruch 8.
10. Verfahren zur Herstellung eines Vorläufers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei
- 10 a) eine DNA gemäß Anspruch 6 in einen Vektor gemäß Anspruch 7 eingebracht wird;
- b) der Vektor aus (a) in eine *E.coli*-Zelle eingeschleust wird;
- c) die *E.coli*-Zelle aus (b) enthaltend den Vektor aus (a) zur Expression benutzt wird; und
- 15 d) der Vorläufer aus dem Kulturüberstand isoliert wird.
11. Verfahren zur Herstellung einer DNA gemäß Anspruch 6, wobei
- a) ausgehend von der cDNA des humanen oder Affen-Insulin mittels PCR und anderer molekularbiologischen Techniken die DNA gemäß Anspruch
- 20 6 erzeugt und
- b) isoliert wird.
12. Verfahren zur Herstellung von humanem Insulin, oder eines Insulinanalogons, wobei
- 25 a) ein Vorläufer gemäß dem Verfahren nach Anspruch 10 erzeugt wird;
- b) der Vorläufer gemäß (a) unter geeigneten Bedingungen so gefaltet wird, daß sich die Disulfidbrücken wie in Humaninsulin ausbilden können, und der RDVP-Y<sub>n</sub>-Teil und gegebenenfalls der Fusionsanteil Fus enzymatisch entfernt werden; und
- 30 c) das humane Insulin oder das Insulinanalogon aufgereinigt wird.

13. Verwendung eines Vorläufers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5 zur Herstellung von Insulin oder eines Insulinanalogons.
14. Verwendung gemäß Anspruch 13, wobei die Herstellung von Insulin oder einem Insulinanalogon gemäß dem Verfahren des Anspruchs 12 erfolgt.
15. Verwendung einer DNA gemäß Anspruch 6, zur Herstellung eines Vorläufers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.
16. Verwendung eines Vektors gemäß Anspruch 8 zur Herstellung eines Vorläufers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.
17. Verwendung einer *E.coli*-Zelle gemäß Anspruch 9 zur Herstellung eines Vorläufers gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5.
18. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 15, 16 oder 17, wobei die Herstellung des Vorläufers gemäß dem Verfahren des Anspruchs 10 erfolgt.

<110> Aventis Pharma Deutschland GmbH

<120> C-Peptid zur verbesserten Herstellung von Insulin und  
Insulinanaloga

<130> 1999/L059

<140> 19947456.7

<141> 1999-10-02

<160> 13

~~<170> PatentIn-Ver. 2.1~~

<210> 1

<211> 87

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:DNA kodierend  
für C-Peptid Variante

<400> 1

cgcgatgttc ctcaggtgga gctgggcggg ggccctggcg caggcagcct gcagcccttg 60  
gcgctggagg ggtccctgca gaagcgc 87

<210> 2

<211> 29

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Variante  
C-Pep-Insulin

<400> 2

Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser  
1 5 10 15

Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg  
20 25



<210> 3  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer PINT  
358fIII

<400> 3  
cccaagaccc gcgatgttcc tcaggtggag ctgggcgggg gccct

45

<210> 4  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Proteinteilsequenz aus PINT 358fIII

<400> 4  
Arg Asp Val Pro  
1

<210> 5  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer PINT  
358revII

<400> 5  
cagctccacc tgaggaacat cgcgggtctt ggggtgtgtag

40

<210> 6  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer

## Salforward

&lt;400&gt; 6

tacacacccg agacccgcga tggttcctcag g

31

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 329rev

&lt;400&gt; 7

cctgaggaac atcgcggtc tcgggtgtgt ag

32

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 91

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Variante  
Insulinvorläufer

&lt;400&gt; 8

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His

1

5

10

15

Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu

20

25

30

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr Arg Asp Val Pro Gln Val Glu

35

40

45

Leu Gly Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gln Pro Leu Ala Leu Glu

50

55

60

Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile

65

70

75

80

Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys Asn

85

90

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer  
140drev

<400> 9

aaaggtcgac tattagccgc agta

24

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Proteinteilsequenz aus PINT 349a

<400> 10

Val Gln Pro Val Asp Arg His His Thr Lys Pro Thr Tyr  
1 5 10

<210> 11

<211> 40

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 349a

<400> 11

cacctgagga acatcgcggt ggtgggtctt ggggtgtgtag

40

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Proteinteilsequenz aus PINT 349b

&lt;400&gt; 12

Pro Lys Thr His His Arg Asp Val Pro Gln Val Glu Leu

1

5

10

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 40

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Beschreibung der künstlichen Sequenz:Pirmer PINT

349b

&lt;400&gt; 13

acccaagacc caccaccgcg atgttcctca ggtggagctg

40

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/09017

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07K14/62 C12N15/10 C12N15/63 C12N15/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, STRAND

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 885 961 A (HOECHST MARION ROUSSEL DE GMBH) 23 December 1998 (1998-12-23) cited in the application abstract page 3, line 7-14; examples 2,6,8 ---	1,4-11, 13-18
A	EP 0 821 006 A (HOECHST AG) 28 January 1998 (1998-01-28) cited in the application page 3, line 45 -page 5, line 6; example 1 ---	1,5-11, 13-18
A	US 4 430 266 A (FRANK BRUCE H) 7 February 1984 (1984-02-07)  page 3, line 20 -page 4, line 58 --- -/--	1-3,6, 10,11, 13-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 February 2001

Date of mailing of the international search report

05/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mateo Rosell, A.M.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte. tional Application No

PCT/EP 00/09017

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 704 527 A (PLIVA PHARM & CHEM WORKS) 3 April 1996 (1996-04-03)  abstract page 2, line 55 -page 3, line 32  ----	1-3,6, 10,11, 13-16
A	SCHMIDT M ET AL: "Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant Escherichia coli" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, vol. 68, no. 1, 5 February 1999 (1999-02-05), pages 71-83, XP004157320 ISSN: 0168-1656 the whole document  ----	1,12
A	VOLLENWEIDER ET AL: "Processing of proinsulin by furin" DIABETES,NEW YORK, NY,US, vol. 44, September 1995 (1995-09), pages 1075-1080, XP002125739 ISSN: 0012-1797 the whole document  ----	1,12
A	YANAGITA MASAHIKO ET AL: "Processing of mutated proinsulin with tetrabasic cleavage sites to mature insulin reflects the expression of furin in nonendocrine cell lines." ENDOCRINOLOGY, vol. 133, no. 2, 1993, pages 639-644, XP000987087 ISSN: 0013-7227 the whole document  ----	1,12
A	STEINER D F ET AL: "The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: Evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals." DIABETE & METABOLISME, vol. 22, no. 2, 1996, pages 94-104, XP000987091 ISSN: 0338-1684 page 94-95 page 98, left-hand column, paragraph 2 -right-hand column, paragraph 2  -----	1,12

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/09017

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0885961	A	23-12-1998	DE 19726167 A	28-01-1999
			AU 7306498 A	24-12-1998
			BR 9803708 A	28-03-2000
			CA 2235443 A	20-12-1998
			CN 1203238 A	30-12-1998
			CZ 9801934 A	17-11-1999
			HU 9801368 A	28-05-1999
			JP 11009291 A	19-01-1999
			NO 982860 A	21-12-1998
			PL 326936 A	21-12-1998
			SK 83698 A	11-01-1999
			TR 9801144 A	18-01-1999
			ZA 9805363 A	19-01-1999
EP 0821006	A	28-01-1998	AU 725201 B	05-10-2000
			AU 3017197 A	05-02-1998
			BR 9704117 A	29-12-1998
			CA 2207078 A	26-01-1998
			CN 1172811 A	11-02-1998
			CZ 9702370 A	18-02-1998
			HU 9701299 A	30-11-1998
			JP 10072496 A	17-03-1998
			NO 973438 A	27-01-1998
			NZ 328421 A	23-12-1998
			PL 321343 A	02-02-1998
			TR 9700685 A	21-02-1998
US 4430266	A	07-02-1984	AR 224933 A	29-01-1982
			AT 5400 T	15-12-1983
			AU 540644 B	29-11-1984
			AU 6871981 A	01-10-1981
			CA 1154435 A	27-09-1983
			DD 157612 A	24-11-1982
			DE 3161475 D	29-12-1983
			DK 136481 A, B,	28-09-1981
			EG 15310 A	31-12-1985
			EP 0037255 A	07-10-1981
			ES 500747 D	16-01-1982
			ES 8201957 A	01-04-1982
			FI 810917 A	28-09-1981
			GB 2073204 A, B	14-10-1981
			GR 73517 A	08-03-1984
			HU 185249 B	28-12-1984
			IE 51172 B	29-10-1986
			IL 62486 A	31-12-1984
			KR 8400946 B	01-07-1984
			NO 811039 A, B,	28-09-1981
			NZ 196609 A	03-02-1984
			PL 230292 A	27-11-1981
			PT 72732 A, B	01-04-1981
			RO 81951 A	21-02-1984
			SU 1301319 A	30-03-1987
			YU 76881 A	30-04-1984
EP 0704527	A	03-04-1996	HR 940432 A	31-08-1997
			BG 62336 B	31-08-1999
			BG 99844 A	29-02-1996
			CA 2155451 A	06-02-1996

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

### Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 00/09017

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0704527	A	CN 1126761 A	17-07-1996
		CZ 9501999 A	14-02-1996
		PL 309882 A	19-02-1996
		SI 9500250 A	29-02-1996
		SK 97195 A	07-02-1996



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09017

<b>A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES</b> IPK 7 C07K14/62 C12N15/10 C12N15/63 C12N15/70		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
<b>B. RECHERCHIERTE GEBIETE</b> Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12N		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, STRAND		
<b>C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN</b>		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 885 961 A (HOECHST MARION ROUSSEL DE GMBH) 23. Dezember 1998 (1998-12-23) in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung Seite 3, Zeile 7-14; Beispiele 2,6,8	1,4-11, 13-18
A	EP 0 821 006 A (HOECHST AG) 28. Januar 1998 (1998-01-28) in der Anmeldung erwähnt Seite 3, Zeile 45 -Seite 5, Zeile 6; Beispiel 1	1,5-11, 13-18
A	US 4 430 266 A (FRANK BRUCE H) 7. Februar 1984 (1984-02-07)  Seite 3, Zeile 20 -Seite 4, Zeile 58  -/--	1-3,6, 10,11, 13-18
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen <input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht *P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist *Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  26. Februar 2001		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts  05/03/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter  Mateo Rosell, A.M.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09017

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 704 527 A (PLIVA PHARM & CHEM WORKS) 3. April 1996 (1996-04-03)  Zusammenfassung Seite 2, Zeile 55 -Seite 3, Zeile 32 ---	1-3,6, 10,11, 13-16
A	SCHMIDT M ET AL: "Temperature-induced production of recombinant human insulin in high-cell density cultures of recombinant Escherichia coli" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY,NL,ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, Bd. 68, Nr. 1, 5. Februar 1999 (1999-02-05), Seiten 71-83, XP004157320 ISSN: 0168-1656 das ganze Dokument ---	1,12
A	VOLLENWEIDER ET AL: "Processing of proinsulin by furin" DIABETES,NEW YORK, NY,US, Bd. 44, September 1995 (1995-09), Seiten 1075-1080, XP002125739 ISSN: 0012-1797 das ganze Dokument ---	1,12
A	YANAGITA MASAHIKO ET AL: "Processing of mutated proinsulin with tetrabasic cleavage sites to mature insulin reflects the expression of furin in nonendocrine cell lines." ENDOCRINOLOGY, Bd. 133, Nr. 2, 1993, Seiten 639-644, XP000987087 ISSN: 0013-7227 das ganze Dokument ---	1,12
A	STEINER D F ET AL: "The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: Evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals." DIABETE & METABOLISME, Bd. 22, Nr. 2, 1996, Seiten 94-104, XP000987091 ISSN: 0338-1684 Seite 94-95 Seite 98, linke Spalte, Absatz 2 -rechte Spalte, Absatz 2 -----	1,12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/09017

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0885961 A	23-12-1998	DE 19726167 A	28-01-1999
		AU 7306498 A	24-12-1998
		BR 9803708 A	28-03-2000
		CA 2235443 A	20-12-1998
		CN 1203238 A	30-12-1998
		CZ 9801934 A	17-11-1999
		HU 9801368 A	28-05-1999
		JP 11009291 A	19-01-1999
		NO 982860 A	21-12-1998
		PL 326936 A	21-12-1998
		SK 83698 A	11-01-1999
		TR 9801144 A	18-01-1999
		ZA 9805363 A	19-01-1999
EP 0821006 A	28-01-1998	AU 725201 B	05-10-2000
		AU 3017197 A	05-02-1998
		BR 9704117 A	29-12-1998
		CA 2207078 A	26-01-1998
		CN 1172811 A	11-02-1998
		CZ 9702370 A	18-02-1998
		HU 9701299 A	30-11-1998
		JP 10072496 A	17-03-1998
		NO 973438 A	27-01-1998
		NZ 328421 A	23-12-1998
		PL 321343 A	02-02-1998
		TR 9700685 A	21-02-1998
US 4430266 A	07-02-1984	AR 224933 A	29-01-1982
		AT 5400 T	15-12-1983
		AU 540644 B	29-11-1984
		AU 6871981 A	01-10-1981
		CA 1154435 A	27-09-1983
		DD 157612 A	24-11-1982
		DE 3161475 D	29-12-1983
		DK 136481 A, B,	28-09-1981
		EG 15310 A	31-12-1985
		EP 0037255 A	07-10-1981
		ES 500747 D	16-01-1982
		ES 8201957 A	01-04-1982
		FI 810917 A	28-09-1981
		GB 2073204 A, B	14-10-1981
		GR 73517 A	08-03-1984
		HU 185249 B	28-12-1984
		IE 51172 B	29-10-1986
		IL 62486 A	31-12-1984
		KR 8400946 B	01-07-1984
		NO 811039 A, B,	28-09-1981
		NZ 196609 A	03-02-1984
		PL 230292 A	27-11-1981
		PT 72732 A, B	01-04-1981
		RO 81951 A	21-02-1984
		SU 1301319 A	30-03-1987
		YU 76881 A	30-04-1984
EP 0704527 A	03-04-1996	HR 940432 A	31-08-1997
		BG 62336 B	31-08-1999
		BG 99844 A	29-02-1996
		CA 2155451 A	06-02-1996

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

PCT/EP 00/09017

Applicant: THUROW, et al.  
 Appl. No.: 10/632,414  
 Filing Date: 8/1/2003  
 Docket No.: DEAV2002/0072 US NP  
**PRIOR ART**